

**Multiple-surface systems for fixing substrates having nucl ophilic groups.**

Patent Number: EP0071704  
Publication date: 1983-02-16  
Inventor(s): SCHUSTER ERWIN DR; FEIL CORNELIA; SIOL WERNER DR; KRAMER DIETER DR; MARKERT GERHARD DR; SUTTERLIN NORBERT DR  
Applicant(s):: ROEHM GMBH (DE)  
Requested Patent: ☐ EP0071704, B1  
Application Number: EP19820104288 19820515  
Priority Number(s): DE19813130924 19810805  
IPC Classification: C08J9/26 ; C08J9/28 ; C12N11/00 ; B01J20/00 ; C07C103/52 ; A61K37/48 ; A61K47/00 ; C08F2/22  
EC Classification: G01N33/543E, B01J20/32, C08J9/26, C08J9/28, C12N11/00, A61K38/43, C12N11/08, C12N9/00, C12Q1/00, G01N33/543  
Equivalents: CA1212058, ☐ DE3130924, ☐ ES8307880, JP1845227C, JP5047195B, ☐ JP58036388, ☐ SU1655301

**Abstract**

1. Large surface area systems with reactive units for bonding substrates containing nucleophilic groups, characterised in that the reactive units for bonding the substrates containing the nucleophilic groups are, from the nature of the manufacture, part of a polymer latex prepared by emulsion polymerisation which is made up of latex particles measuring from 0.03 to 6  $\mu$ m and the polymer latex itself is aggregated to form a large surface area system and/or is fixed to a carrier material with a large surface area.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## Description

Oberflächenreiche Systeme zur Fixierung von nucleophile Gruppen enthaltenden Substraten Die Erfindung betrifft oberflächenreiche Systeme zur Fixierung von nucleophile Gruppen enthaltenden Substraten, insbesondere zur Immobilisierung von biologisch relevanten, d.h. primär zur Wechselwirkung mit biologischen Systemen befähigten Substanzen und funktionalen Einheiten, vorzugsweise biologischen Ursprungs.

Die Immobilisierung von Bio(makro)molekülen an Trägermolekülen ist eines der am intensivsten bearbeiteten Themen sowohl im Bereich der reinen Forschung als auch im Bereich der Biotechnologie.

Unter dem speziellen Aspekt der Immobilisierung von Enzymen kann man die vorgeschlagenen bzw. praktizierten Fixierungstechniken wie folgt unterscheiden:

- 1) Kovalente Bindung an eine feste Trägerphase (solid phase)
- 2) Kovalente Bindung an lösliche Polymere
- 3) Physikalische Adsorption an eine feste Trägerphase
- 4) Vernetzung an festen Oberflächen
- 5) Vernetzung mit bifunktionellen Reagentien
- 6) Einschluss in einer Gelphase
- 7) Einkapselung CVgl. R.D. Fall in Enzyme Engineering" Vol. II, ed.

E.K. Pyl & L.B. Wingard, Plenum Press. 1974, US-PS 3 650 900 Melrose, Rev. Pure and Appl. Chem. 21, 83-119 (1971).

Am eingehendsten wurde bisher die unter 1) genannte Technik der kovalenten Bindung an eine feste Trägerphase bearbeitet.

Die einschlägige Literatur lässt jedoch keinen Zweifel an der Tatsache, dass die vielfältigen Aufgaben, die man mit Hilfe der Fixierung von Bio-Makromolekülen zu lösen hoffte, wie z.B. Reinigung, Trennung und Bindung von Enzymen, Fixierung von Mikroorganismen, Affinitätschromatographie, Immunreaktionen, Aufgaben der klinischen Diagnostik usw. nicht mit einer einzigen Methodik gelöst werden können. Auch in Fällen, wo auf spezifische Probleme zugeschnittene Lösungen vorliegen, z.B. bei der Immobilisierung bestimmter Enzyme an bestimmten Trägern, stößt die Übertragung vom Labormassstab in den technischen Massstab oft auf schwer zu überwindende Hindernisse.

Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, zu Lösungen zu kommen, die die Bedürfnisse der Technik besser befriedigen.

Die japanische Offenlegungsschrift 77 143 821 beschreibt die Immobilisierung von Enzymen oder Mikroben durch ein Verfahren, in dem aus einer wässrigen Polymerdispersion und einem Enzym auf einer Glasplatte ein Film hergestellt wird.

Die Anwendung geschieht in Form einer, gegebenenfalls zerkleinerten Folie.

Die Lösungen des Standes der Technik weisen schwerwiegende Nachteile auf. In der Regel ist die Oberflächenkonzentration der fixierten, biologisch wirksamen Substanzen zu gering. Die reaktiven Oberflächen können auch nicht beliebig durch Zerkleinern der polymeren Träger erhöht werden, da kleine Teilchen die Tendenz zur Instabilität besitzen und vielfach nicht mehr technisch sinnvoll einzusetzen sind.

Zwar ist es bekannt (siehe oben), makromolekulare Verbindungen durch Adsorption an Träger zu binden, jedoch ist deren Verwendbarkeit beschränkt, da sie sich leicht wieder eluieren lassen.

In der DE-OS 21 12 740 wird ein Durchflussreaktor beschrieben, der einen makroporigen Reaktionskern, dessen polymere Oberfläche adsorptionsfördernde Nitril-, Säureamid- bzw. Ureidgruppen aufweist.

Nach erfolgter physikalischer Adsorption der Enzyme an der festen Trägerphase wird eine Vernetzung z.B. mittels eines Dialdehyds vorgenommen.

Aus der DE-OS 22 60 184 ist ein Verfahren zur Herstellung von trägerfixierten makromolekularen Verbindungen bekannt, bei dem eine makromolekulare Verbindung A zuerst mit einer Verbindung B umgesetzt wird, die wenigstens eine zur Kupplung mit der makromolekularen Verbindung A befähigte Funktion und wenigstens eine weitere zur Polymerisation befähigte Funktion aufweist, dann ein Molekularsiebmaterial eines die makromolekulare Verbindung A ausschliessenden Vernetzungsgrads in entquollenem Zustand zugesetzt und die polymerisationsfähige Gruppe des Kupplungsprodukts AB in Molekularsiebmaterial gegebenenfalls zusammen mit weiteren Monomeren polymerisiert wird.

Es wurde nun gefunden, dass oberflächenreiche Systeme mit reaktiven Einheiten zur Bindung von nucleophilen Gruppen enthaltenden Substraten besonders vorteilhafte Lösungen darstellen, wenn die reaktiven Einheiten zur Bindung der die nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrate Bestandteile eines Polymerlatex sind, der selbst zu einem oberflächenreichen System aggregiert und/oder an einem oberflächenreichen Trägermaterial fixiert ist.

Es wurde weiter gefunden, dass sich zur kovalenten Immobilisierung von biologisch relevanten Substanzen und funktionalen Einheiten Polymerlatizes gemäss den Patentansprüchen besonders eignen.

**Der Polymerlatex:** Bei der Synthese der erfindungsgemässen Polymerlatizes ist von bestimmendem Einfluss die beabsichtigte Verwendung bei der Herstellung reaktiver oberflächenreicher Gebilde. Der Polymerlatex kann daher von unterschiedlichem Aufbau sein, abhängig davon, ob der Latex zur Erzeugung eines dünnen, reaktiven Films auf einem an sich oberflächenreichen Gebilde verwendet werden soll, oder ob der Latex durch einen locker agglomerierten Aufbau die Gesamtoberfläche des gebildeten Systems gegenüber der Oberfläche des Trägermaterials noch erheblich vergrössern soll. Falls die Erzeugung eines dünnen, reaktiven Films auf dem Trägermaterial angestrebt wird, kann der Latex bei einer Temperatur oberhalb der minimalen Filmbildungstemperatur OMFT = DIN 53787) auf den Träger aufgebracht werden. Soll der Latex hingegen die Oberfläche des Trägermaterials noch vergrössern, so sind insbesondere kleine, (beispielsweise im Bereich von 0,03 bis 3  $\mu\text{m}$ ) in sich starre Latex-Teilchen, die unter den Anwendungsbedingungen nicht verfilmen, von Vorteil. Gegebenenfalls können die nicht-filmbildenden Latexteilchen durch Zusatz von untergeordneten Mengen - vorzugsweise bis zu 30 Gew.-% - eines filmbildenden Latex miteinander und mit dem Träger verbunden werden.

**Substrate:** Die erfindungsgemässen, oberflächenreichen Systeme sind allgemein zur Fixierung von Substraten geeignet, die nucleophile Gruppen aufweisen. Sie eignen sich besonders zur Fixierung von funktional und/oder morphologisch definierten, biologisch relevanten, insbesondere biologisch wirksamen Einheiten oder Substanzen.

Bei den biologisch relevanten Substanzen und funktionalen Einheiten, die in der Regel zur Wechselwirkung mit biologischen Systemen befähigt sind, handelt es sich vorzugsweise um solche biologischen Ursprungs, die gegebenenfalls gegenüber der nativen Form modifiziert sein können.

Eine besonders wichtige Rolle spielen dabei Makromoleküle, insbesondere Proteine.

**Reaktive Einheiten / nucleophile Gruppen:** Im allgemeinen besitzen die zur Wechselwirkung mit biologischen Systemen befähigten Substanzen bzw. Strukturen ihrerseits kopplungsfähige Gruppen, die mit den (reaktiven Einheiten der Polymerlatizes) reagieren und eine kovalente Bindung eingehen können; in der Regel sind dies nucleophile Gruppen. Vorzugsweise finden solche an sich bekannten reaktiven Einheiten (funktionellen Gruppen) Anwendung, die in wässriger Lösung mit stärkeren Nucleophilen als Wasser reagieren und vom Wasser in dem physiologisch sinnvollen pH-Bereich, d.h. insbesondere in Bereich von 5,0 bis 9,0, insbesondere von 6,5 bis 8,0 nicht oder nur in untergeordneter Masse angegriffen werden. Die Auswahl der funktionellen Gruppen trägt der Tatsache Rechnung, dass das zu fixierende Material, insbesondere das Material biologischen Ursprungs als nucleophile Gruppe im allgemeinen die (freie) Amino-Gruppe, daneben gegebenenfalls noch phenolische-, Hydroxy- oder Thiolgruppen aufweist. Die erfindungsgemässen Polymerlatizes können ganz allgemein aus radikalisch polymerisierbaren Vinylverbindungen hergestellt werden: Vorzugsweise aus Monomeren auf der Basis von Acrylsäure und/oder Methacrylsäurederivaten und/oder Styrol und/oder Vinylestern, insbesondere Vinylacetat.

Der Aufbau des erfindungsgemässen Polymerlatex in seiner reaktiven Form kann daher in stark schematisierter Form wie folgt dargestellt werden:

wobei X für die funktionellen Gruppen zur kovalenten Fixierung steht, vorzugsweise solchen, die die vorstehend genannten Bedingungen erfüllen. R stellt dabei einen "Abstandshalter" (Spacer) zwischen funktionellen und polymerisierbaren Einheiten dar. Grösse und Typ des Abstandshalters sind vergleichsweise unkritisch. Typische Vertreter von derartigen Abstandshaltern sind beispielsweise Alkylengruppen von C1 bis C20, vorzugsweise C2 bis C12, darüber hinaus andere ursprünglich (d.h. vor dem Einbau) bifunktionelle Gruppen enthaltende Einheiten, wobei sowohl am polymerständigen als am funktionalen Ende eine Verknüpfung über Amid-, Ester-, Äther-, Thioäther-, Harnstoff-, Urethan-, Sulfonamid- und ähnliche Gruppen erfolgen kann. Im allgemeinen bringt der Abstandshalter eine Distanz der funktionellen Gruppen X von der Polymerhauptkette im Bereich von 0,5 - 4 nm. In einer Reihe von Beispielen kann die Gruppe R ganz fehlen, d.h. n kann den Wert 0 oder 1 besitzen.

X hat in der Regel die Bedeutung einer von den in Frage kommenden Nucleophilen angreifbaren Gruppe, d.h. einer aktivierten Gruppe; vorzugsweise die Bedeutung einer Sulfonsäurehalogenid-, einer Thioisocyanatgruppe, eines aktivierten Esters, einer Thiocarbonyldioxy-, Carbonyl-imidoyldioxy-, Haloethoxy-, Haloacetoxy-, Oxiran-, Aziridin-, Formyl-, Keto-, Acryloyl- oder Anhydridgruppe.

Als Sulfonsäurehalogenide kommen die Chloride und Bromide, als Haloacetoxy die Fluoro-, Chloro- und Bromverbindungen, als Esterkomponente der aktivierten Ester solche von Hydroxylaminverbindungen, wie des N-Hydroxysuccinimids oder des N-Hydroxyphthalimids, von (mittels elektronenanziehenden Gruppen) aktivierten Phenolen, wie von Halogenphenolen, wie Trichlorphenol oder von Nitrophenolen, von heterocyclischen Lactamen, wie Pyridon infrage.

wobei gegebenenfalls Kohlenstoffatome durch Ätherbrücken ersetzt sein können.

Besonders bevorzugt sind Oxiran-, Keto-, Formyl-, Sulfonsäurechlorid-, Thioisocyanatgruppen sowie aktivierter Carbonsäureester sowie Carbonsäureanhydride. Bei den Monomeren des Typs Z'-(RD<sub>n</sub>-X stellt demnach Z' eine (radikalisch) polymerisationsfähige Einheit und n 0 oder 1 dar.

Solche radikalisch polymerisationsfähige Einheiten sind z.B. Vinylgruppen, wobei Z' beispielsweise die Bedeutung

besitzt, worin R1 für Wasserstoff oder Methyl bzw.

für CH<sub>2</sub> - COOR<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CONHR<sub>2</sub> oder CH<sub>2</sub>-CON (R<sub>2</sub>)<sub>2</sub> steht, wobei R<sub>2</sub> einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeutet.

Desweiteren kann Z' sich von der Äthylsäure ableiten:

Als reaktionsfähige und zugleich polymerisierbare Einheiten sind ferner Maleinsäureanhydrid und Itaconsäureanhydrid anzusprechen sowie Acrolein, Methacrolein, Methylvinylketon und aktivierte Vinyl Ester. Besonders bevorzugt sind Derivate der (Meth)-acrylsäure und des Maleinimids sowie Maleinsäure und Itaconsäureanhydrid.

Zur Verdeutlichung des Formelschemas Z'-R-X seien die folgenden Beispiele aufgeführt:

(Polymerisierbarer aktivierter Ester mit Spacer)

(Glycidylacrylat)

(2-(Chloroacetoxy)-äthylmethacrylat) CH<sub>2</sub> = C(CH<sub>3</sub>) - CO - O - C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> (2,4,5-Trichlorphenylmethacrylat) R = O  
CH<sub>2</sub> = C(CH<sub>3</sub>) - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> Br (2-Bromäthylmethacrylat)

(Allylglycidyläther) CH<sub>2</sub> = C(CH<sub>3</sub>) COO - CH<sub>2</sub> - CHOH - CH<sub>2</sub> - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> -

(Anlagerungsprodukt von Methacrylsäure an 1,4 Butandiol diglycidylether)  $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CSNH} - (\text{CH}_2)_6 - \text{N} = \text{C} = \text{S}$  (Anlagerungsprodukt von Acrylsäure -2-Hydroxyethylester an 1,6-Hexandiisothiocyanat)  $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{O} - \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{Cl}$  (Chloressigsäurevinylester)

(4-Maleimido-buttersäure-pentachlorphenylester)  $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{COO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_2 - \text{CH}_3$  ((4-Methylsulfinylphenyl)-methacrylat)  $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{H}$  (Propargylacrylat) Bei den übrigen, am Aufbau der Polymerlatices beteiligten Einheiten (A und B in der schematischen Darstellung), handelt es sich definitionsgemäss um solche, die dem Latex die zu fordernden Eigenschaften, nämlich ggf. die Hydrophilie und die zweckmässige Härte verleihen. Als Anhalt für die er wünschte Härte im wasserfreien Zustand kann gelten TmaX-60 bis 200 C, insbesondere -20 bis 1400C (nach DIN 53445).

Andererseits sollten die am Aufbau des Polymerlatex beteiligten Monomeren selbst zweckmässigerweise k in stark nucleophilen Gruppen (wie z.B.  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ) enthalten.

Weiter können die Bestandteile des Polymerlatex vernetzt sein. Für diese Vernetzung steht Y als Symbol.

Die Härte bzw. die sonstigen relevanten Eigenschaften der Polymerisate aus den individuellen Monomeren ist bekannt, desgleichen der Beitrag zu den Eigenschaften von Copolymerisaten [vgl. US-PS 2 795 564, H. Rauch-Puntigam, T. Völker in "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer Verlag, Berlin 1967, S.303-304, T.G. Fox Bull.Am.Phys.Soc.

1, 123 (1956)1.

Im Sinne der schematischen Darstellung seien die in erster Linie für den nicht-hydrophoben bzw. hydrophilen Charakter des Polymerlatex verantwortlichen Bestandteile als 2, weitere Bestandteile, deren Auswahl in erster Linie auf die resultierende Härte des Gesamtpolymerisats abgestimmt werden muss, als A bezeichnet, d.h. die Monomeren des Typs 9 gehören im Sinne der getroffenen Unterscheidung dem nicht-hydrophilen bzw. hydrophoben Typ an.

Der Index p für den monomeren Bestandteil? in dem vorstehend angegebenen Formelschema dient zur Klarstellung des Sachverhalts, dass die primär für die zweckmässige Härte des Gesamtpolymerisats einzusetzenden Ionomeren :t anteilmässig auf die Komponente 3 abzustimmen ist, so dass p einen Wert von 0 bis zu einem Wert annehmen kann, der einem An \* teil von B am Gesamtpolymerisat von 95 Gew.-t entspricht.

Die für den erfindungsgemäss zu verwendenden Polymerlatex genannten Bedingungen werden z.B. durch Copolymerisate vom Methacrylat- und/oder Acrylattyp erfüllt, wobei der qualitative und der quantitative Anteil so zu bemessen ist, dass die im Anspruch aufgestellten Kriterien für den Polymerlatex erfüllt sind.

Als nicht hydrophobe bzw. hydrophile Bestandteile : kommen z.B. gegebenenfalls substituierte Methacrylamid und Acrylamide der allgemeinen Formel I

worin R1, Wasserstoff oder Methyl und R3 und R4 unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen Alkylr st mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, also unsubstituierte Amide sowie die mit primären und sekundären Aminen gebildeten Amide sowie Verbindungen, bei denen R3 und R4 zusammen mit dem Stickstoffatom einen, gegebenenfalls ein oder mehrere zusätzliche Heteroatome, insbesondere Stickstoff oder Sauerstoff enthaltenden, gegebenenfalls alkylsubstituierten Ring bilden, infrage. Besonders genannt seien (Meth)-acrylsäureamid, N-Methyl- (bzw. Isopropyloder -Butyl)-(meth) -acrylsäureamid, N,N-Dimethyl- (meth) - \* , vorzugsweise 0 - 60 Gew.-%, acrylsäureamid, desweiteren (Nleth) acrylsäuremorpholid (Sonderfall, in dem d r Stickstoff über R3 und R4 Teil eines Rings ist) und N-Vinylpyrrolidon-2.

Ferner hydroxygruppenhaltige Monomere des Acrylat- oder des Methacrylattyps, insbesondere hydroxygruppenhaltige Ester oder Amid der Acryl- und der Methacrylsäure sowie Alkoxyalkylester- und/oder Amide der Acryl- und der Methacrylsäure zu den hydrophilen Monomeren des Typs B, z.B.

Vertreter der allgemeinen Formel II

worin R1 Wasserstoff oder Methyl, R2 Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Q

Sauerstoff oder eine Gruppe -NR<sub>2</sub>', worin ' für Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht, n eine ganze Zahl von 1 bis 3, vorzugsweise 2, und m eine ganze Zahl von 1 bis 25 bedeutet, mit der Massgabe, dass, wenn Q für Sauerstoff steht, n nicht gleich 1 sein soll. Besonders genannt sind das Hydroxyäthylacrylat, Hydroxyäthylmethacrylat, 2-Hydroxyäthyl (meth) - acrylamid, 2-Hydroxypropyl (meth) acrylamid, Monoester der (Meth)- acrylsäure des Glycerins und anderer Polyole.

Weiter fallen unter den Monomerentyp B Sulfoäthylacrylate und Sulfoäthylmethacrylate sowie Sulfoäthylacrylamide und Sulfoäthylmethacrylamide. Ebenfalls als hydrophile Gruppen in die Schale des Latex eingebaut werden können polymerisierbare Säuren, wie (Meth)acrylsäure, Itaconsäure oder Maleinsäure oder polymerisierbare tert. Amine, wie 2-N,N-Dimethylaminoäthyl- (meth) acrylamid bzw. - (meth) acrylsäureester oder 3-N,N Dimethylaminopropyl- (meth)acrylamid bzw. -ester.

Zur Vermeidung einer einseitigen Aufladung der Latexteilchen sollten diese sauren bzw. basischen Gruppen stets gleichzeitig in einem Teilchen vorhanden sein (z.B. Methacrylsäure und 2-N,N-Dimethylaminoäthyl- (methacrylat).

Als monomere des Typs A kommen nicht oder höchstens begrenzt wasserlösliche monomere in Frage, wobei der qualitative und der quantitative Anteil so zu bemessen ist, dass das nachstehend aufgeführte Kriterium der Härte des resultierenden Polymerisats erfüllt wird: a) Ester der Acryl- und/oder der Methacrylsäure, mit C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkoholen, insbesondere der Methyl-, Äthyl- sowie die Propyl- und Butylester der Methacrylsäure, sowie der Methyl-, Äthyl- die Propyl- und Butylester und 2-Äthylhexyl- ester der Acrylsäure, b) copolymerisierbare Monomeren vom Typ der Vinylester, insbesondere Vinylacetat, Vinylpropionat, Vinylbutyrat und Vinylisobutyrat.

Der Anteil der Komponente A am Gesamtpolymerisat kann, weil in Abstimmung mit den übrigen Bestandteilen, innerhalb relativ weiter Grenzen schwanken, beispielsweise von 0 bis 99 Gew.-%, vorzugsweise 20 bis 99 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtpolymerisat.

Neben den oben beschriebenen Monomerkomponenten können die erfindungsgemässen Polymerlatices noch vernetzende Monomere enthalten (Y in der schematischen Darstellung, wobei der Index m Null oder eins sein kann; d.h. der Vernetzer kann fehlen).

Unter "vernetzenden Monomeren" werden wie üblich z.B.

solche Monomere verstanden, die zwei oder mehrere reaktive Doppelbindungen im Molekül enthalten, wie z.B. mit der Acrylsäure oder vorzugsweise der Methacrylsäure veresterte Di- oder Polyole sowie Allylverbindung, wie z.B. Allylmethacrylat, Triallylcyanurat u.a.

Genannt seien z.B. Ethylenglykoldimethacrylat, 1,4-Butandiol dimethacrylat, Triglykoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat.

Der Anteil an Vernetzer - falls vorhanden - richtet sich nach der Hydrophilie des Gesamtpolymerisats. Mit zunehmender Hydrophilie des Latexteilchens kann auch ein zunehmender Anteil an Vernetzer als vorteilhaft erscheinen.

Er beträgt im allgemeinen zwischen 0 und 50 Gew.-%, vorzugsweise zwischen 0,2 und 15 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtpolymerisat.

Der Anteil der funktionellen Monomeren am Gesamtpolymerisat kann - in Abhängigkeit von den konkret verwendeten Monomeren in weiten Grenzen schwanken. Während z.B. zur kovalenten Fixierung des hydrophilen Gruppen tragenden Substrats wenigstens 0,1 % des Monomeren Z'-R-X erforderlich ist, ist der Maximalgehalt dieses Monomeren sehr stark von dem eingesetzten Monomeren selbst abhängig. Für den Fall, dass das reaktive Monomere selbst eine gewisse Hydrophilie aufweist, bzw. unter den Herstellungsbedingungen der Polymerdispersion zu einem gewissen Masse zu einer hydrophilen Verbindung hydrolysiert, so kann der Anteil dieses Monomeren Z'-R-X bis zu 99,9 Gew.-% betragen (z.B. im Falle des Glycidylmethacrylats, Rest = 0,1 % = Vernetzer, z.B. Butandiol-1,4dimethacrylat).

Als Anhalt für die untere Grenze kann somit 0,1 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtpolymerisat, angesehen werden, als Anhalt für die obere Grenze 99,9 Gew.-% > vorzugsweise 1 bis 50 Gew.-%.

**Herstellung der Polymer-Latices** Die Herstellung der Latex-Dispersionen kann nach den bekannten Regeln in der Emulsionspolymerisation erfolgen, beispielsweise in Anlehnung an DE-OS 18 04 159, DE-OS 19 10 488 und DE-OS 19 10 532, wobei die gewünschte Grösse der Latex-Teilchen durch die Emulgatorkonzentration zu Beginn der Polymerisation eingestellt wird. Im allgemeinen liegt die Emulgatorkonzentration zu Beginn der Emulsionspolymerisation zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Polymerisationsansatz. Die Grösse der Latex-Teilchen soll zwischen 0,03 und 6  $\mu$  liegen, vorzugsweise zwischen 0,03 und 1  $\mu$ . Als Emulgatoren können die bekannten anionischen und nichtionischen Emulgatoren verwendet werden, beispielsweise Fettalkoholsulfate und -sulfonate > -phosphate und phosphonate, Alkalisalze langkettiger Fettsäuren, langkettige Sarkoside sowie oxäthylierte Fettalkohole, substituierte Phenole, die zum Teil sulfiert sein können sowie andere in der Emulsionspolymerisation verwendete Emulgatoren (Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. XIV/I, S. 133-560, G. Thieme-Verlag, 1961).

Die Verwendung kationischer Tenside empfiehlt sich nur insoweit als sich diese von tertiären oder quartären Ammoniumsalzen ableiten. Desweiteren können auch einpolymerisierbare Emulgatoren verwendet werden.

Als Initiatoren können ebenfalls die allgemein bei Emulsionspolymerisationen üblichen verwendet werden (vgl. J. Brandrup, E.H. Immergut, "Polymer Handbook", second Edition, J. Wiley & Sons; H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, "Acryl- und Methacrylverbindungen", Springer-Verlag 1967). Genannt seien Peroxide, Hydroperoxide, Persäuren und Azoverbindungen, z.B. Kaliumperoxidisulfat, Wasserstoffperoxid u.a.m.

Die Konzentration der Initiatoren liegt in der Regel im üblichen Bereich, beispielsweise bei 0,01 bis 1,0 Gew.-%, bezogen auf die Monomeren.

Der Feststoffgehalt der Dispersion kann je nach Teilchengrösse und Hydrophilie der Teilchen zwischen 10 und 60 Gew.-% liegen.

Die Synthese der Latex-Teilchen muss so schonend durchgeführt werden, dass die genannten funktionalen Gruppierungen aus den Monomeren Z'-R-X weitgehend erhalten bleiben, weil nur so eine nachfolgende kovalente Fixierung von Molekülen mit > NH-, -SH- und -COOH-Gruppen möglich ist.

Dabei ist anzumerken, dass der Erhalt der funktionalen nucleophil angreifbaren Gruppen aus den Monomeren Z'-R-X in bzw. an der Oberfläche der Latex-Teilchen um so schwieriger ist, je hydrophiler der Aufbau der Latex-Teilchen ist.

Dies soll am folgenden Beispiel belegt werden: Bei völlig übereinstimmender Herstellung (Synthesetemperatur: 80 °C, pH: 7,0, 4 Std. Polymerisationsdauer (Emulsionszulauf). (Zugabe des reaktiven Monomeren Glycidylmethacrylat jeweils nur in der 4. Stunde des insgesamt 4 Std. dauernden Zulaufs), 1 Std. Nacherhitzen bei 80 °C findet man den folgenden Oxirangruppengehalt in der Dispersion: Bruttozusammensetzung des Polymeren Oxirangruppen- \*) Gehalt im Latex 42,5 % Methylmethacrylat 42,5 % Isobutylmethacrylat 5 % Ethylenglykoldimethacrylat 71 % 10 % Glycidylmethacrylat 40 % Methylmethacrylat 40 % Isobutylmethacrylat 5 % Ethylenglykoldimethacrylat 15 % 10 % Glycidylmethacrylat 5 % Methacrylamid bezogen auf das eingesetzte Glycidylmethacrylat.

Für eine schonende Herstellung der Latex-Teilchen sind die folgenden Punkte massgeblich:

- 1.) Herstellung der Dispersion in einem pH-Bereich, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit des Wassers mit den reaktiven Gruppen am geringsten ist (in der Regel ist dies ein pH von etwa 7).
- 2.) Herstellung bei möglichst niedriger Temperatur.
- 3.) möglichst kurze Polymerisationsdauer.

#### 4.) Abwesenheit von starken Nucleophilen im Latex-Teilchen.

Zu 1.) Die Synthese der Latex-Teilchen im neutralen pH-Bereich ist am einfachsten durch eine Pufferung des Systems (z.B. mit Phosphat-Puffer) möglich.

Gegebenenfalls kann auf eine Pufferung durch Salzzusatz völlig verzichtet werden, z.B. wenn andere Teile der Rezeptur als Puffersubstanzen wirken können, so z.B. bei Verwendung von Alkalisalzen langkettiger Phosphorsäureester als Emulgatoren oder bei Einsatz des Natriumsalzes der 4,4'-Azo bis (cyanovaleriansäure).

Zu 2. und 3.)

Punkt 2 und 3 beinhalten eine möglichst geringe thermische Belastung der reaktiven Gruppen tragenden Latex-Teilchen. Dabei gilt jedoch folgende Einschränkung: Da vor allem der Gehalt an reaktiven Gruppen auf der Latexoberfläche von Bedeutung ist, ist es durchaus möglich nur die äussere Hülle des Latex-Teilchen unter Zuhilfenahme der oben genannten reaktiven Gruppen herzustellen. So ist z.B. ein Kern-Schale-Aufbau anwendbar, wobei der Latex-Kern völlig frei von reaktiven Monomeren hergestellt wird, dann gelten naturgemäss die Einschränkungen für eine schonende Latex-Herstellung nur für die Schale.

Die Polymerisation wird entweder bei niedrigen Temperaturen (z.B. < 50°C) mit Hilfe eines Redoxsystems durchgeführt (wobei jedoch darauf zu achten ist, dass Teile des Redox-Systems die reaktiven Gruppen nicht zerstören, z.B. Bisulfit die Oxirangruppen) oder aber mit thermisch zerfallenden Initiatoren oder mit Hilfe eines Redox-Systems bei Temperaturen bis zu 900°C.

<#s> Die Polymerisationsdauer sollte 8 Std. nicht über schreiten.

Zu 4.) Da der Latex reaktive Gruppen enthält, die eine kovalente Fixierung von wNH-, -SH-, oder -OH Gruppen haltigen Molekülen ermöglichen soll, ist die Anwesenheit von solchen Gruppen im Latex nur in untergeordneter Masse möglich. Dies gilt insbesondere für die > NH- und die -SH-Gruppen. Die Anwesenheit von OH Gruppen im Latex ist weniger kritisch.

Herstellung der oberflächenreichen Gebilde Die erfindungsgemässen Polymerlatices werden bevorzugt auf geeignete Träger aufgebracht.

In erster Linie eignen sich inerte (im allgemeinen nicht-wasserlösliche) Träger, insbesondere feste Träger, vorzugsweise mit möglichst grosser Oberfläche. Weiter praktischen Gesichtspunkten bieten sich insbesondere poröse Körper als Träger an, z.B. auch geschäumte Materialien, Schwämme, weitere Faserstrukturen, Vlies usw. Geeignet sind sowohl anorganische als organische Trägermaterialien.

Genannt seien beispielsweise Träger auf Siliciumdioxid bzw. Silikatbasis, insbesondere auch feinverteiltes Siliciumdioxid, z.B. in Form von Gelen bzw. als Aerosol, ferner Träger auf der Basis von Aluminiumoxid und/oder anderen Metalloxiden und auf Basis von Tonen, wie z.B.

Füllerden, Bleicherden usw. und Keramik. Ferner fein verteilte anorganische Pigmente, wie Titandioxid, Baryt, ferner Kreide, Talkum, Gips, Bimsstein, Glas, Aktivkohle, rostfreier Stahl usw. Ausserdem geeignet erscheint z.B.

ein wabenförmig aufgebautes Material auf Cordierit-Basis (Mg<sub>2</sub>Al<sub>4</sub>Si<sub>5</sub>O<sub>18</sub>).

Als Träger organischer Herkunft bieten sich sowohl (modifizierte) Naturprodukte als auch synthetische Materialien polymerer Natur an. Aus dem Bereich der Naturprodukte sind insbesondere Fasereiwissstrukturen, wie z.B. Wolle und solche auf Kohlehydratbasis (Cellulose, z.B. Zellstoff, Stärke, insbesondere vernetzte Dextrane, usw.) zu nennen.

Ebenso eignen sich Materialien auf der Basis synthetischer Polymerer, wie z.B. Polyamide, Polyester, Polyurethan, Polyacrylnitril, Polyimidschäumen.



Die genannten Stoffe bieten besonders interessante Aspekte, wenn sie als Flächengebilde, wie z.B. Vliese, satten oder (nicht geleimtes) Papier oder entsprechende dreidimensionale makroporöse Körper zur Anwendung kommen.

Die oben beschriebenen, reaktiven Latex-Teilchen können in an sich bekannter Weise durch Tränken, Sprühen oder andere Techniken auf oberflächenreiche Gebilde, wie z.B.

Papier, Watte, Vlies u.v.a. auch anorganische Trägermaterialien aufgebracht werden.

Dabei kommen zwei verschiedene Bindungsmechanismen zur Anwendung: cX.) Der Latex ist bei der Auftragungstemperatur film bildend

In diesem Falle wählt man eine Latexmasse, die kleiner ist als die Masse des Trägermaterials (fest/ fest), um die Gesamtoberfläche des Trägermaterials nicht zu verkleinern.

Der Latex ist bei der Auftrags- und/oder der Anwendungstemperatur nicht filmbildend

In diesem Fall kann je nach Oberflächenbeschaffenheit des Trägermaterials das Verhältnis Latex (Festschubstanz) : Trägerschubstanz von 1 : 100 bis 100 : 1 reichen.

Gegebenenfalls kann in diesem Falle auf einen festen

Träger völlig verzichtet werden. Dazu ist es erforderlich den Latex durch Sprühtrocknung,

Gefriertrocknung oder durch Ausfällen (z.B. durch

Natriumsulfat) bzw. durch weitere Methoden, wie

Koagulation infolge von Hitzeeinwirkung, Ausfrieren,

Einwirkung von Lösungsmitteln, zu agglomerieren, so dass eine möglichst grosse innere Oberfläche erhalten bleibt.

Sofern die Verbindung der einzelnen Latex-Teilchen untereinander nicht durch Filmbildung erfolgt, kann ihre Verknüpfung untereinander bzw. zum Träger durch kovalente Bindungen geschehen. Im Falle der Oxirangruppen enthaltenden Latex-Teilchen kann diese Bindung z.B. durch Reaktion des Oxiranrings mit den OH-Gruppen benachbarter Latex-Teilchen bzw. mit OH-Gruppen des Trägermaterials erfolgen.

Gegebenenfalls kann diese kovalente Verknüpfung der Latex-Teilchen durch den Einsatz von multifunktionellen Nucleophilen, z.B. Polyaminen, verstärkt werden. Die Fixierung der Latexteilchen auf den Träger oder zueinander kann jedoch auch über Nebenvale nzb i ndungen oder durch Verkitten mit untergeordneten Mengen einer weichen, fließfähigen Substanz, z.B. mit Latexteilchen niedrigerer Glas temperatur erfolgen. Diese weichen Latexteilchen können ebenfalls funktionelle Gruppen enthalten.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform besteht darin, zum Ausfällen die funktional und/oder morphologisch definierten biologisch wirksamen Einheiten selbst einzusetzen, z.B. kann man ein zu bindendes Protein, z.B. ein Enzym, selbst als multifunktionellen Vernetzer einsetzen. Dieses Verfahren ist vor allem bei besonders kleinen Latex-Teilchen anwendbar.

Der Einsatz der oberflächenreichen Gebilde als Katalysatoren (z.B. nach Fixierung von Enzymen) erfolgt je nach Art des vorgegebenen Trägermaterials (z.B. im Festbett).

Der Einsatz der sprühtrockneten bzw. mit Salz oder in Gegenwart von Enzymen ausgefallten Dispersionen erfolgt vorzugsweise im Batch oder im Fließbett. Der hohen Porosität und sehr hohen katalytischen Aktivität dieser Materialien steht eine nur geringe mechanische Festigkeit gegenüber.

Für den Fall, dass das zu bindende nucleophile Gruppen enthaltende Substrat nicht bereits bei der Agglomeration der Latex-Teilchen anwesend war, erfolgt die Umsetzung dieses Substrats mit den oberflächenreichen, reaktiven Gebilden unter den üblichen Bedingungen z.B. Bindung des Enzyms Trypsin an einen oxiran-gruppenhaltigen Träger in einem unimolaren Phosphatpuffer (pH 7,5) in 72h bei 23°C). Als Substrate können allgemein funktional und/oder morphologisch definierte, biologisch wirksame Einheiten oder Substanzen dienen. Genannt seien z.B. Proteine allgemein, insbesondere Enzyme, Blutbestandteile und

Blutinhaltstoffe (Blutfaktoren), z.B. Albumine, Immunoglobuline, Faktoren der Blutgerinnung, Zellmembranproteine, Peptidhormone u.ä. Weiterhin seien erwähnt hochmolekulare, biogene Substrate, die gegebenenfalls durch Farbstoffe markiert sein können, z.B. zur Anwendung in der Diagnostik.

Neben dem Einsatz als Katalysator ist vor allem auch ein Einsatz in der (Affinitäts)-Chromatographie und allgemein im Bereich der Diagnostik möglich.

Bei dem Einsatz - z.B. als Diagnosepapier - kann es von Vorteil sein, einen - (z.B. pH- oder Redox-sensitiven) Farbstoff physikalisch oder kovalent mit einzulagern. Damit kann z.B. bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Substrats der entsprechende Reaktionspartner, z.B. ein Enzym, durch eine Farbänderung nachgewiesen werden.

Zum Zwecke der Diagnose kann der reaktive Latex auf Papierstreifen oder Teststäbchen aus beliebigem Trägermaterial aufgebracht werden.

Die mit dem Reagenz (z.B. einem Enzymsubstrat und gegebenenfalls zusätzlich mit einem Farbstoff) umgesetzten Teststreifen oder Teststäbchen sind dann im trockenen Zustand unter Einhaltung bestimmter Temperaturbedingungen beliebig lagerfähig.

Der eigentliche Test kann zu gegebener Zeit durch einfaches Eintauchen des Teststreifens oder Stäbchens in ein den Reaktionspartner (z.B. ein Enzym) enthaltendes Medium (z.B.

Urin, Blutserum etc.) erfolgen. Neben diesen spezifischen Diagnoseanwendungen kann das oberflächenreiche System ganz generell als bioaffiner Indikator Verwendung finden.

Bei einer Verwendung als Katalysator, z.B. als Biokatalysator, können die reaktiven Latices in zwei prinzipiell verschiedenen Versionen zum Einsatz kommen.

Bei Anwendung im Festbett wird der Latex im allgemeinen an eines der oben beschriebenen Trägermaterialien fixiert. Die Umsetzung mit dem Katalysator kann vor oder nach dieser Fixierung stattfinden. Man interessiert sich wegen ihrer hohen Spezifität und Selektivität Enzyme (es können aber auch einfacher aufgebaute und unspezifisch wirkende Gruppen (z.B. quartäre Ammoniumverbindungen oder Imidazol u.a. Heterocyclen zur Katalyse einer Hydrolyse) zur Anwendung kommen).

Die erfindungsgemässen reaktiven oberflächenreichen Gebilde sind zur Immobilisierung aller Klassen von Enzymen geeignet, beispielsweise zur Fixierung von Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen.

Im Falle einer Verwendung im Fliessbett sind neben den kleineren, auch für das Festbett geeigneten Träger-Katalysator-Kombinationen in erster Linie trägerfreie Latexaggregate einsetzbar, die als Pulver, Aufschlämmung oder in einer anderen grobdispersen Form zur Anwendung kommen können. Die Umsetzung mit dem Enzymsubstrat kann am Originallatex selbst oder nach dessen Agglomeration erfolgen. Im übrigen sind dieselben Katalysatoren einsetzbar wie sie weiter oben im Falle der Festbettkatalyse beschrieben worden sind.

Falls für eine chemische Reaktion mehrere Enzyme in das Reaktionsgeschehen eingreifen müssen, besteht häufig das Problem, dass diese Enzyme nicht nebeneinander existenzfähig sind. Im Falle der kovalenten Bindung an die beanspruchten Trägermaterialien lassen sich solche Unverträglichkeiten häufig herabsetzen oder ganz ausschliessen. So ist es bei dem erfindungsgemässen Verfahren durchaus möglich zwei oder mehrere, verschiedene Enzyme zu fixieren.

Es kann aber auch vorteilhaft sein, Enzymkombinationen direkt im Zellverband zur Anwendung zu bringen, d.h. ganze Mikroorganismen zu immobilisieren. Dies kann besonders vorteilhaft mit den beanspruchten, reaktiven Latices geschehen.

Durch Menge und Teilchengrösse der Latices ist die Substratzugänglichkeit eines solchen Systems besonders gut zu steuern.

So eignen sich die erfindungsgemässen, oberflächenreichen Systeme zur Fixierung von therapeutisch verwendbaren Enzymen, die z.B. oral angewendet werden können (z.B. Proteasen und/oder Lipasen und/oder Amylasen).

Auf diese Weise können demzufolge auch noch höhermolekulare Substrate umgesetzt werden.

Für eine solche Einbettung oder Fixierung kommen besonders in Frage: 1.) Viren, prokariotische und eukariotische Zellen und deren Untereinheiten, (siehe 2.), sowie Zellhybride, wie sie z.B. zur Herstellung von monoclonalen Antikörpern benutzt werden.

2.) Ausserdem eignen sich die erfindungsgemässen reaktiven oberflächenreichen Gebilde zur Immobilisierung von Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien, Mikrosomen, Membranteilen, Zellkernen und deren Untereinheiten.

Die Anwendung der erfindungsgemässen Latex-Trägerkombinationen in der (Affinitäts)chromatographie erfolgt völlig analog wie bei der Katalysatoranwendung beschrieben.

Lediglich, die an den reaktiven Latex zu bindenden reaktiven Moleküle sind auf den spezifischen Verwendungszweck ausgerichtet. Eine Anwendungsmöglichkeit der oberflächenreichen Systeme gemäss der vorliegenden Erfindung ist die Anwendung als bioaffines Sorbens.

Dabei können durchaus Überschneidungen auftreten, etwa in der Art, dass ein gebundenes Enzym, das als Katalysator eingesetzt werden kann, Anwendung findet in der chromatographischen Reinigung eines Enzyminhibitors.

Eine besonders interessante Einsatzmöglichkeit bieten die Träger bei der Beseitigung von Spuren toxischer Stoffe (z.B. Blutwäsche, Wasseraufbereitung etc.).

Es kann aber auch das reaktive oberflächenreiche System eingesetzt werden. In diesem Falle ist die Entfernung von nucleophilen Verunreinigungen aus wässrigem Medium möglich, z.B. die Entfernung von toxischen Aminen, Mercaptanen und anderen Schadstoffen aus wässrigen Medien.

Darüber hinaus kann das erfindungsgemässe, oberflächenreiche System mit multifunktionellen Substanzen umgesetzt werden, die mindestens eine nucleophile Gruppe (zur Fixierung am Latex) und mindestens eine weitere funktionelle Gruppe aufweisen, die zur spezifischen Wechselwirkung mit in wässrigem Medium befindlichen Substanzen oder funktionellen Einheiten geeignet ist. Gruppen mit der genannten spezifischen Wechselwirkung können beispielsweise Komplexbildner sein; genannt sei z.B. das Umsetzungsprodukt der Amino-diessigsäure mit einem oxiranhaltigen Latex u.ä.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemässen reaktiven oberflächenreichen Systeme liegen in der Anwendung als stationäre Phase in der präparativen organischen Chemie. So kann z.B. ein auf diese Weise erhaltener S-S-Brückenhaltiger Latex als schonendes Oxidationsmittel verwendet werden, wobei die Entfernung des entstehenden Mercaptans entfällt.

Von ganz besonderem Interesse ist die Anwendung als stationäre Phase in der präparativen Peptidsynthese.

Dabei kann einerseits das zu synthetisierende Peptid an dem oberflächenreichen System aufgebaut werden, es kann aber auch das oberflächenreiche System aktivierte Reaktionspartner, z.B. Kupplungsaktive Aminosäuren oder Kupplungsagentien, z.B. nur schwer in Lösung überzuführende Carbodiimide aufnehmen. Im letzten Falle bleibt das aufzubauende Peptid in der wässrigen Phase gelöst.

Prinzipiell sind für chromatographische Zwecke sowohl die an feste Träger gebundene Latex-Wirkstoff-Kombination als auch die lose aggregierte Latex-Wirkstoff-Kombination (Säule) einsetzbar.

Die nachstehenden Beispiele stellen eine Auswahl zur Erläuterung der erfindungsgemässen Immobilisierungsprinzipien dar.

**Beispiel 1 Herstellung einer oxirangruppenhaltigen Dispersion** In einem Polymerisationsgefäß, , ausgestattet mit Rück- flusskühler, Rührer und Thermostat wird eine Lösung aus  
10 g Phosphatpufferlösung pH 7,0 (Titrisol, WErck)  
0,4 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-c4-cyano- valeriansäure)  
0,3 g Natriumlaurylsulfat  
555 g destilliertem Wasser vorgelegt und auf 800C erwärmt.

In diese Vorlage tropft man ebenfalls bei 800C innerhalb von 4 Stunden eine Emulsion, hergestellt aus:  
360 g Methylmethacrylat  
210 g Butylacrylat  
30 g Glycidylmethacrylat  
2 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano valeriansäure)  
3 g Natriumlaurylsulfat und  
840 g destilliertem Wasser.

Anschliessend wird noch weitere 2 Stunden bei 80°C gerührt, danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Man erhält eine koagulatfreie Dispersion.

Feststoffgehalt ca. 30 %, pH-Wert: 7,3, Viskosität 2 mPa.s.

**Beispiel 2 Herstellung einer oxirangruppenhaltigen Dispersion** In einem Polymerisationsgefäß, ausgestattet mit Rück- flusskühler, Rührer und Thermostat wird eine Lösung aus  
50 g Phosphatpufferlösung pH 7,0 (Titrisol, Merck)  
0,3 g Natriumlaurylsulfat  
0,3 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano- valeriansäure)  
515 g destilliertem Wasser vorgelegt und auf 800C erwärmt.

In diese Vorlage tropft man ebenfalls bei 800C innerhalb von 4 Stunden eine Emulsion, hergestellt aus:  
300 g Methylmethacrylat  
210 g Butylacrylat  
90 g Glycidylmethacrylat  
2 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano valeriansäure)  
3 g Natriumlaurylsulfat und  
840 g destilliertem Wasser.

Anschliessend wird noch 90 Min. bei 800C gerührt, danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Man erhält eine gut filtrierbare koagulatfreie Dispersion.

Feststoffgehalt ca. 30 Co, pH-Wert: 7,1, Viskosität 1 mPa.s.

**Beispiel 3 Herstellung einer oxirangruppenhaltigen Dispersion** In einem Polymerisationsgefäß, ausgestattet mit Rück flusskühler, Rührer und Thermostat wird eine Lösung aus  
6,5 g Natriumlaurylsulfat  
0,6 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano- valeriansäure)  
10,0 g Phosphatpufferlösung pH 7,0 (Titrisol, Merck)  
600,0 g destilliertem Wasser vorgelegt und auf 800C erwärmt.

In diese Vorlage tropft man bei 800C innerhalb von 3 Std. eine Emulsion, hergestellt aus:  
18 g blethacrylamid  
11 g Äthylenglykoldimethacrylat  
150 g Methylmethacrylat  
180 g Glycidylmethacrylat  
1,5 g Natriumlaurylsulfat  
2,0 g Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano valeriansäure) und  
900 g destilliertem Wasser.

Anschliessend wird noch weitere 30 Min. bei 800C gerührt, danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

Man erhält eine gut filtrierbare, koagulatfreie Dispersion, Feststoffgehalt: 19,4 %, pH-Wert: 7,7, Viskosität 2 mPa.s.

Beispiel 4 Herstellung einer oxirangruppenhaltigen Dispersion Man verfährt wie in Beispiel 3, dosiert jedoch eine Emulsion mit veränderter Monomierzusammensetzung zu.

Monomierzusammensetzung:

18 g Methacrylamid

36 g Äthylenglykoldimethacrylat

125 g Methylmethacrylat

180 g Glycidylmethacrylat Hilfsstoffe, Polymerisationsdauer und Polymerisationstemperatur wie in Beispiel 3 beschrieben.

Es resultiert eine gut filtrierbare, koagulatfreie Dispersion.

Feststoffgehalt: 19,7 %, pH-Wert: 7,6, Viskosität: 1 mPa.s.

Beispiel 5 Immobilisierung des Enzyms Ribonuclease durch Umsetzung mit Latex gemäss Beispiel 4 100 mg Ribonuclease (aus Pankreas, Merck, Artikel Nr. 24570) werden in 1 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst. Zu dieser Lösung gibt man unter Rühren 1 ml der Dispersion gemäss Beispiel 2. Anschliessend wird 3 Tage bei 230C stehengelassen.

Zur Aufarbeitung wird dreimal in jeweils 50 ml 1MNaCl Lösung aufgeschlämmt und anschliessend zentrifugiert.

Danach wird dieser Waschvorgang noch zweimal mit 50 ml 0,05 M. Phosphatpuffer wiederholt.

Ausbeute: 1,1 g Feuchtsubstanz.

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgte durch alkalimetrische Titration bei 370C und pH 7,5, mit RNA als Substrat.

Verwendung Feuchtein- Aktivität waage Ist U/g Feuchteinwaage

1 1,10 101

2 1,75 54,8

3 1,74 51,0

4 1,68 55,0

5 1,71 51,9

1 U entspricht 1  $\mu$ mol/min, gemessen anhand der

Anfangsgeschwindigkeit 1) E.C. 2.7.7.16 Beispiel 6 Immobilisierung des Enzyms Trypsin durch Umsetzung mit dem Latex gemäss Beispiel 4 Man verfährt wie im Beispiel 5, verwendet jedoch als Enzym 100 mg Trypsin (20 mg in Rind, Merck, Artikel Nr. 24579).

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgte durch alkalimetrische Titration bei 37 C und pH 7,5 (BAEE) und pH 8,0 (Casein).

Aktivität [U/g] \*) Aktivität [U/g] ) Verwendung (Substrat: BAEE) (Substrat: Casein)

1 174 42,5

2 163 26,7

3 161 23,3

4 161 23,3 \*) Aktivitäten jeweils bezogen auf die Feuchteinwaage, 1 U entspricht 1  $\mu$ mol/min, gemessen anhand der Anfangsgeschwindigkeit

BAEE = N $\alpha$ -Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid 2) E.C. 3.4.4.4 Beispiele 7 - 11 Immobilisierung des Enzyms Trypsin durch Umsetzung mit dem Latex gemäss Beispiel 4 Man verfährt wie im Beispiel 6, variiert jedoch das Verhältnis Enzym/Latex.

Aktivität: Beispiel Einwaage2) Einwaage Verhältnis Aktivi-

Nr. Trypsin Fmg/Latex-Feststoff Trypsin/ tat [u/g] [mg] Latex-Feststoff (Substrat:Casein)

7 20 200 1 : 10 3,7

8 40 200 1 : 5 13,8

9 80 200 1 : 2,5 22,2 6 100 200 1 : 2 23,3

10 160 200 1 : 1,25 26,4

11 200 200 1 : 1 22,3 \*) Aktivität jeweils bei der 3. Verwendung Beispiel 12 Immobilisierung des Enzyms PC-Artase durch Umsetzung mit dem Latex gemäss Beispiel 4 Man verfährt wie im Beispiel 5, verwendet jedoch als Enzym 100 mg Penicillin-Amidase (Escherichia coli).

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgt durch Messung bei 37°C und pH 7,8. (Substrat: Penicillin Kalium G).

#### Aktivitätsmessung

1. Verwendung 42,7 U/g Feuchteinwaage

2. Verwendung in 2,0 U/g Feuchteinwaage

3. Verwendung 41,6 U/g Feuchteinwaage Beispiel 13 Immobilisierung des Enzyms Ribonuclease durch Umsetzung mit dem Latex gemäss Beispiel 3 Man verfährt wie im Beispiel 5, verwendet jedoch zur Vernetzung des Enzyms den Latex gemäss Beispiel 3.

#### Aktivitätsmessung

1. Verwendung 68,5 U/g Feuchteinwaage

2. Verwendung 61,8 U/g Feuchteinwaage

3. Verwendung 61,8 U/g Feuchteinwaage

4. Verwendung 61,0 U/g Feuchteinwaage 3) E.C. 3.5.1.11 Beispiel 14 Fixierung des Enzyms ENase an ein durch Tränken mit einer oxirangruppenhaltigen Dispersion aktiviertes Papier 100 ml der Dispersion gemäss Beispiel 1 werden mit 500 ml destilliertem Wasser verdünnt. Mit dieser etwa 5 zeigigen Dispersion tränkt man ein ca. 100 cm<sup>2</sup> grosses Stück Papier (Whatman Medium flow). Anschliessend wird abgepresst, eine Stunde bei Raumtemperatur belassen und danach 30 min bei 80°C getrocknet. Das so behandelte Papier enthält 20 g Polymerisatfeststoff pro m<sup>2</sup>.

Bei Temperaturen unter -15°C kann dieses reaktive Papier wenigstens 12 Monate gelagert werden.

Fixierung des Enzyms Ribonuclease 100 mg Ribonuclease werden in 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) gelöst. Mit dieser Lösung tränkt man das mit dem oxirangruppenhaltigen Latex behandelte Papier und lässt anschliessend 72 Std. bei 23°C stehen. Danach wird abgepresst und dreimal mit in NaCl- und zweimal mit 0,05 M Phosphatpufferlösung (pH 7,5) gewaschen.

Aktivitätsmessung (3. Verwendung): 2 U/g Feuchtpapier

Bedingungen: 37°C, pH 7,5 ) (aus Pankreas, Merck, Artikel Nr. 24570) Beispiel 15 Man verfährt wie im Beispiel 14, verwendet jedoch das Enzym Trypsin. 2) Aktivitätsmessung (3. Verwendung) 2,5 U/g Feuchtpapier \*) Substrat BAEE, pH 7,5, 37°C Beispiel 16 Man verfährt wie im Beispiel 14, verwendet jedoch zum Tränken des Papiers eine konzentriertere Dispersion (100 ml der Dispersion gemäss Beispiel 1, verdünnt mit 200 ml destilliertem Wasser).

Trocknungsbedingungen: 12 Std. bei 25°C im Umlufttrockenschrank.

Polymerisatfeststoff/m<sup>2</sup> Papier = 33 g Anschliessend Fixierung des Enzyms Trypsin wie im Beispiel 14 für das Enzym RNase beschrieben.

Aktivitätsmessung (3. Verwendung): 4,1 U/g Feuchtpapier

Substrat BAEE, pH 7,5, 37°C Beispiel 17 Man verfährt wie im Beispiel 16, verwendet zur Tränkung den Latex gemäss Beispiel 2 (Verdünnung wie im Beispiel 16: 100 ml Dispersion in 200 ml destilliertem Wasser).

Polymerisatfeststoff/m<sup>2</sup> Papier = 27 g Aktivitätsmessung (3. Verwendung): 7 U/g Feuchtpapier

Substrat BAEE, pH 7,5, 37°C Beispiel 18 100 ml der Dispersion gemäss Beispiel 1 wird mit 200 ml destilliertem Wasser verdünnt, damit wird eine Watte (Dicke 2 mm) besprüht, anschliessend wird 12 Std. bei

Raumtemperatur getrocknet.

Polymerisatfeststoff/m<sup>2</sup> Watte = 39 g Aktivitätsmessung (3. Verwendung, Enzym RNase = 1)  
2,1-U/g Feuchtwatte Mossbedingungen wie im Beispiel 14 beschrieben.

Beispiel 19 in verfährt wie im Beispiel 14: Tränkung des Papiers mit der oxirangruppenhaltigen Dispersion gemäss Beispiel 1, Trocknung, Umsetzung mit dem Enzym Ribonuclease. 1) Das 72 Std. mit Enzymlösung behandelte Papier wird jedoch ohne weitere Reinigung 24 Std. zusätzlich mit einer 0,005%igen Lösung von 4z-Amino-azobenzol-2-carbonsäure in 0,05 M Phosphatpufferlösung behandelt, anschliessend wird dreimal mit 1N NaCl- und zweimal mit 0,05 M Phosphatpufferlösung (pH 7,5) gewaschen.

Zur Verwendung als Indikator (Substratnachweis) wird das Papier noch zweimal mit 1N NaCl-Lösung gewaschen.

Bei Anwesenheit eines Substrats zeigt das Papier Farbumschlag von gelb nach orange.

Aktivität des Teststreifens bei pH 7,5 (37°C) : 1,5 U/g  
Feuchtgewicht Beispiel 20 Immobilisierung von Escherichia coli durch Umsetzung mit dem Latex gemäss Beispiel 4.

Zu 10 ml einer 20 %igen Zellsuspension von Escherichia coli in physiologischer Kochsalzlösung werden 10 ml der Dispersion gemäss Beispiel 4 gegeben. Anschliessend lässt man 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen.

Es resultiert ein Netzwerk, das sich gut durch Zentrifugation reinigen lässt.

Aktivitäten Substrat: Penicillin-Kalium (2 %in), 37°C

Verwendung Aktivität [U/g Feuchtkatalysator]

1 118

2 66

3 55

4 53 Damit sind die Aktivitäten des immobilisierten Escherichia coli durchaus vergleichbar mit denen des nicht immobilisierten Escherichia coli:

Verwendung Aktivität

1 128,5

2 132,5

3 132,5

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## Claims

Oberflächenreiche Systeme zur Fixierung von nucleophile Gruppen enthaltenden Substraten Patentansprüche 1. Oberflächenreiche Systeme mit reaktiven Einheiten zur Bindung von nucleophilen Gruppen enthaltenden Substraten, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Einheiten zur Bindung der die nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrate Bestand teil eines Polymerlatex sind, der selbst zu einem oberflächenreichen System aggregiert und/oder an einem oberflächenreichen Trägermaterial fixiert ist.

2. oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aggregation der Polymerlatices zu einem oberflächenreichen System durch Sprühtrocknung unterhalb der minimalen Filntildungstemperatur CMFT) des individuellen Polymerlatex vorgenommen wird.

3. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aggregation der Polymerlatices zu einem oberflächenreichen System durch Gefriertrocknung erfolgt.

4. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aggregation der Polymerlatices zu einem oberflächenreichen System durch thermische Koagulation, Ausgefrieren oder durch Fällern mit Elektrolyten oder Lösungsmitteln erfolgt.

5. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aggregation der Polymer latices zu einem oberflächenreichen System durch Aus fällen mit dem die nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrat erfolgt.

6. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass das die nucleophilen Gruppen enthaltende Substrat Protein-Charakter hat.

7. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Ausfällen be nutzen, nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrate aus funktional und/oder morphologisch definierten, biologisch wirksamen Einheiten bestehen.

8. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1, 5, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass das die nucleo philen Gruppen enthaltende Substrat ein Enzym ist.

9. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass das die nucleophilen Gruppen enthaltende Substrat aus mehreren, unterscheid baren Enzymen besteht.

10. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zum Aus fällen benutzte, nucleophile Gruppen enthaltenden Substrate aus Mikroorganismen oder deren Unterein heilten, Viren, eukariotischen oder prokariotischen Zellen und/oder deren Untereinheiten oder Zell hybriden oder Zellorganellen, wie Mitochondrien, Mikrosomen, Membranteile, Zellkerne oder deren Unter einheiten, bestehen.

11. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1 und 2 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Aggregation der Polymerlatices zu einem oberflächenreichen Gebilde ein oder mehrere Arten d r die nucleophil n Gruppen enthaltend n Substrate bereits anwesend sind.

12. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 1, dadurch hergestellt, dass auf ein oberflächenr iches Träger material eine Latex-Dispersion aufgebracht wird, deren Latexteilchen als Bestandteile reaktive Gruppen zur



Bindung der die nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrate aufweisen und der Latex am Trägermaterial fixiert wird.

13. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 12 dadurch gekennzeichnet, dass der auf das oberflächenreiche Trägermaterial aufzubringende Latex filmbildend ist und durch einfaches Auftrocknen auf dem oberflächenreichen Trägermaterial fixiert wird.

14. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass der zu fixierende Latex an sich nicht filmbildend ist und durch Beifügung geringfügiger Mengen eines filmbildenden Latex oder mittels der reaktiven Einheiten bzw. weiterer funktioneller Gruppen oder reaktiver Verbindungen am Trägermaterial fixiert wird.

15. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenreiche Trägermaterial im wesentlichen aus organischem Material aufgebaut ist.

16. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Material aus Vinyl polymeren, Kohlehydraten, Proteinen, Polyaminosäuren, Polyamiden oder Polyestern aufgebaut ist.

17. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 12, 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenreiche Trägermaterial ein Faservlies darstellt.

18. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 12, 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenreiche Trägermaterial eine Watte darstellt.

19. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 12, 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenreiche Trägermaterial geschäumt ist.

20. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenreiche Trägermaterial aus anorganischem Material aufgebaut ist.

21. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das anorganische Trägermaterial in Vliesform oder in Form eines porösen Körpers vorliegt.

22. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das anorganische Material aus Siliciumdioxid bzw. Silikaten, Glas, Aluminiumoxid und/oder andere Metalloxiden, Tonen, Sand, Keramik, Kohle, nicht-rostendem Stahl, besteht.

23. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymerlatex aus radikalisch polymerisierbaren Monomeren aufgebaut ist.

24. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 und 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Polymerlatex auf Basis von Acrylsäure- und/oder Methacrylsäurederivaten und/oder Styrol und/oder Vinylacetat aufgebaut ist.

25. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Einheiten als Bestandteil eines Polymerlatex solche sind, die mit den nucleophilen Gruppen enthaltenden Substraten in wässriger Lösung und im pH-Bereich von 5 - 10 unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren.

26. Oberflächenreiche Systeme gemäss Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Einheiten Oxiran-, Keto-, Formyl-, Sulfonsäure halogenid-, Thioisocyanatgruppen, aktiviert

Carbonsäureester und/oder -  
Carbonsäureanhydride oder aktiviert Doppelbindungen darstellen.

27. Oberflächenreiche Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich noch einen, gegebenenfalls pH- oder redoxsensitiven Farbstoff enthalten.

28. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die am Trägermaterial fixierten Latices mit einem nucleophilen Gruppen enthaltenden Substrat umsetzt.

29. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 13 bis 28 zur Fixierung von funktional und/oder morphologisch definierten, biologisch wirksamen Einheiten.

30. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 13 bis 29 zur Immobilisierung von Proteinen.

31. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 13 bis 30 zur Bindung von Enzymen.

32. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, 13 bis 30 zur Bindung von Blutproteinen und Blutfaktoren.

33. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss Anspruch 32, zur Bindung von Albumin, Immunoglobulinen, Faktoren der Blutgerinnung, Zellmembranproteinen und Peptidhormonen.

34. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, 13 bis 30, zur Immobilisierung von hochmolekularen, biogenen Substraten.

35. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, 13 bis 30 und 34, zur Immobilisierung von mit Farbstoffen kovalent markierten, hochmolekularen, biogenen Substraten.

36. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 35, als Katalysatorsysteme.

37. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 36, als Biokatalysatoren, insbesondere mit Enzymwirkung.

38. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 35, als bioaffine Indikatoren, beispielsweise als immobilisierte Substrate.

39. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 35, als bioaffine Sorbentien.

40. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 13 bis 30, zur Entfernung von nucleophilen Gruppen enthaltenden Verunreinigungen aus wässrigen Medien.

41. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, zur Umsetzung mit bi- oder multifunktionellen Substanzen, die mindestens eine nucleophile Gruppe zur Fixierung am Latex und mindestens eine weitere funktionelle Gruppe aufweisen, die zur spezifischen Wechselwirkung mit in wässrigem Medium befindlichen Substanzen oder funktionellen Einheiten geeignet ist.

42. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere funktionelle Gruppe eine komplexierende Wirkung ausübt.

43. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 42, als stationäre Phase in der präparativen organischen Chemie.
44. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 und 43 zur Peptidsynthese.
45. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 1, 5 bis 9 und 31, dadurch gekennzeichnet, dass das gebundene Enzym zu therapeutischen Zwecken verwendet wird.
46. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss Anspruch 45 zur oralen Applikation.
47. Verwendung der oberflächenreichen Systeme gemäss den Ansprüchen 45 und 46 zur Bindung von Proteasen und/oder Lipasen und/oder Amylasen.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2